

氏名	八浪公夫 やつ なみ きみ お
学位の種類	薬学博士
学位記番号	薬博第197号
学位授与の日付	昭和56年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	がん化肥満細胞の増殖と機能におけるプロスタグランディンの役割に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 富田謙吉 教授 高木博司 教授 山科郁男

論文内容の要旨

細胞の増殖と機能の調節に関与している因子の作用機構の検索は、機能保持細胞の培養維持が困難なこともあって、いまだ十分には行われていない。マウスのがん化肥満細胞 (mastocytoma P-815) は、その旺盛な増殖能と共に、肥満細胞としての機能であるヒスタミン・セロトニン等の生理活性物質の産生が良好に保持され、かつ大量に調製し易い機能保持がん細胞である。一方、プロスタグランジン (PG) は、最近オータコイドの一つとして細胞の増殖や生理活性の調節における役割が注目されており、肥満細胞においてもその SRS-A やヒスタミンの分泌を介しての I 型アナフィラキシー炎症の形成過程にも関与している可能性が推定されているが、その詳細はいまだ明らかではなく、その解明が望まれている。そこで著者は、がん化肥満細胞を用い、PG の細胞増殖と機能に対する作用、PG の細胞受容体反応と細胞内情報伝達物質である cAMP との関連を検討するとともに、PG の細胞受容体の部分精製を行った。

(I) 肥満細胞におけるプロスタグランジンの生理活性調節

対数増殖期にあるがん化肥満細胞の増殖は、PG の添加により抑制され、その効果は $PGE_1 \geq PGE_2 > PGI_2 > PGA_1 \geq PGF_{2\alpha}$ の順であった。この PG の増殖抑制作用は、cAMP 分解酵素 (PDase) の阻害剤である 1-methyl-3-isobutyl-xanthine (MIX) の添加で増強されること、また、細胞内の cAMP 含量を増加させる作用のある adenosine あるいは N^6, O^2 -dibutyryl cAMP (DB-cAMP) によっても増殖が抑制されること、更に、増殖抑制効果と細胞内 cAMP 含量の変化とが良好な対応を示すことから、PG の細胞増殖抑制活性は cAMP を介する作用と考えられる。一方、細胞増殖の抑制と同時にヒスタミン生成、肥満細胞プロテアーゼ活性、酸性多糖体への ^{35}S の取り込みが著しく亢進し、これらの活性が DB-cAMP や MIX の添加で増強され、cycloheximide で抑制されることから、PG が cAMP 増加反応を介しこれら肥満細胞の機能活性を亢進することを明らかにした。

Ca^{2+} -ionophore: A 23187 によるヒスタミン遊離時の cAMP と内因性 PGs との関連を検討した結果、細胞に添加した PGs ($E_1 \geq E_2 > I_2 > A_1 \geq F_{2\alpha}$) は、A 23187 さよるヒスタミン遊離を抑制し、同時に、

cAMP 生成反応を促進した。また、A 23187 は $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内への取り込みを促進するとともに basal および PGE_1 による cAMP 生成反応を阻害した。一方、A 23187 の添加により PGs (E_1 他) 含量および ^{14}C -arachidonic Acid (AA) からの E-type ^{14}C -PG の生成が促進し、同時に AA を多く含むリン脂質 (特に phosphatidylcholine, phosphatidylinositol) の代謝が亢進した。また、これらの変化は DB-cAMP の投与により抑制された。これらの結果より、肥満細胞のヒスタミン遊離反応において、内因性の PGs と cAMP, Ca^{2+} との間に相互にフィードバックシステムが存在するものと考えられる。

(II) プロスタグランジン受容体と cAMP 生成反応

がん化肥満細胞の PGE_1 受容体反応を ^3H - PGE_1 を用い Scatchard Plot により解析した結果、特異的結合受容体は二種類存在し (K_d : 2.14×10^{-9} M, 1.05×10^{-8} M), その結合部位での特異性は $\text{PGE}_1 \geq \text{PGE}_2 \gg \text{PGF}_{2\alpha} \geq \text{PGA}_1$ の順で、各々による cAMP 含量の増大効果の順序と一致することが判明した。 PGE_1 による cAMP 生成反応は、添加後 30 秒で最大値を示した後、速やかに減少し、いわゆる脱感作 (refractoriness) 現象を示した。この減少は、PDase 阻害剤の添加で解消され、refractoriness 現象と PDase との密接な関係を明らかにした。更に、refractoriness 現象を示す cAMP 生成反応が反応温度 ($0^\circ \sim 37^\circ$) に依存していることを見出し、 23° 以上で refractoriness 現象が発現すること、それ以下では cAMP 増加反応は温度に比例していることを見出した。なお、cAMP 生成反応の初速度および ^3H - PGE_1 の受容体結合反応は、共に 37° で最大であった。また、 PGE_1 処理細胞に $37^\circ \rightarrow 0^\circ$ の温度処理を行うと、結合した PGE_1 量は不変であるが、細胞内 cAMP 含量は 37° のそれに比して減少し、この減少は MIX の添加により抑制された。また、細胞に 23° 以下の温度処理 ($37^\circ \rightarrow 23^\circ$ 以下 $\rightarrow 37^\circ$) を行うことにより refractoriness 現象が解消された。更に、 PGE_1 処理数分後に PDase 活性の増大が認められた。以上の結果は、PG による cAMP 生成調節反応の一つとして考えられる refractoriness 現象が、膜結合性の PDase 活性の増大と、 PGE_1 の結合による細胞膜の性状の変化によることを示唆するものと考えられる。

(III) プロスタグランジン受容体の部分精製と諸性質

本細胞より単離した膜画分に含まれる PGE_1 受容体の諸性質は、 ^3H - PGE_1 の結合飽和時間の早さ、解離の遅延などを別として細胞レベルで調べた受容体の諸性質と良く一致した。 PGE_1 受容体の単離報告はまだまだないのでそれを試みたところ、受容体は非常に不安定であるが、リガンドとの結合により安定化されることが判明した。 ^3H - PGE_1 と結合した膜画分受容体は、Sephrose 6B カラムで exclude されるが、Triton X-100 あるいは Nonidet P 40 処理により分子量約 14 万に可溶化され、SDS ゲル電気泳動の結果、更に分子量約 2.5 万の ^3H - PGE_1 結合ペプチドが得られた。一方、 PGE_1 未結合受容体は、Triton X-100 処理により ^3H - PGE_1 結合能が著しく減弱した。同様に、膜画分受容体は、低濃度の phospholipase A_2 (PLA_2) や PLC 処理により ^3H - PGE_1 結合活性を失なうが、 ^3H - PGE_1 結合受容体は酵素処理に著しく抵抗した。更に膜画分受容体は、 50° 以上の熱処理や trypsin 等の処理によっても ^3H - PGE_1 結合能が低下した。以上の結果から、がん化肥満細胞の PGE_1 受容体は lipoprotein 様の性質を有し、受容体周辺の構造を結合反応に必要とし、リガントが結合する事によりその構造が安定化されるものと思われる。

以上の諸事実から著者は、がん化肥満細胞に対する PG による細胞増殖抑制効果とヒスタミン等の生理

活性物質の生成促進効果および分泌抑制効果を認めた。更に、これらの作用が PG 受容体を介する cAMP の生成によるものであることを明らかにし、今まで単離されていない PG 受容体の部分精製に成功した。

論文審査の結果の要旨

がん細胞の増殖機構のために細胞の分裂と機能分化との相互調節の仕組みならびにこれに関与する細胞内外の調節因子の検討が今日強く要望されている。しかし、かかる研究に適切な機能腫瘍細胞株の種類は少ないためその検討は十分には行われていない。著者はマウスのがん化肥満細胞 (mastocytoma P-815) (MC) が旺盛な増殖能と共に正常肥満細胞の機能発現であるヒスタミン、ヘパリン産生能等を低値ながら保持していることに注目し、MC を用いて検討を行い以下の成果を得た。(1) MC の増殖は prostaglandin (PG) の培地への添加さより抑制され、その効力の強さは $PGE_1 \geq PGE_2 > PGA_1 \geq PGF_{2\alpha}$ の順であった。この PGE_1 の作用は cAMP の分解酵素 (cAMP phosphodiesterase, PDase) の阻害剤 1-methyl-3-isobutyl-xanthine (MIX) の添加で著明に増強され、且つ増殖抑制効果と細胞内 cAMP 量の増大とが良く対応した。一方、PG による増殖抑制と共に、細胞内ヒスタミン生成、 $[^{35}S]SO_4^{2-}$ の酸性多糖体へのとりこみが亢進し、これらの反応も MIX により増強されたことから、PG は cAMP を介して MC の増殖を抑制し、且つその機能をも亢進していることが分った。(2) PGE_1 は Ca^{2+} 存在下、 Ca^{2+} ionophore A 23187 による MC からのヒスタミン遊離を抑制した。また A 23187 添加により細胞内 PGE 量及び ^{14}C -アラキドン酸からの ^{14}C - PGE_2 生成ならびに ^{14}C -アラキドン酸を含むリン脂質の代謝が亢進した。また、これらの変化は dibutyryl cAMP の添加により抑制された。従って MC からのヒスタミン遊離には、膜リン脂質、 Ca^{2+} 、PG、cAMP が相互に関連して作用している可能性が示唆された。(3) MC には PGE_1 受容体が 2 種 ($K_d = 2.14 \times 10^{-9} M$ と $1.05 \times 10^{-8} M$) があり、PG に対する特異性は $PGE_1 \geq PGE_2 \gg PGF_{2\alpha} \gg PGA_1 \geq PGD_2 \geq PGI_2$ の順であったが、cAMP 増強能は PGI_2 は PGE_1 より遙かに強大であり、 PGE_1 受容体とは異なる PGI_2 受容体の存在が示唆された。(4) PGE_1 の cAMP 生成反応には不応現象 (refractoriness) がある。それが MIX 添加で解消され、且つ PGE_1 添加 2 分以内に PDase 活性が著明に増大するので、不応現象は PDase 活性と密接に関連している。また不応現象は MC の ($37^\circ \rightarrow 20^\circ - 37^\circ$) の温度処理でも解消するので PGE_1 の膜受容体結合による膜の性状変化も不応に関与していることを明らかにした。(5) 受容体の PGE_1 結合による安定化を利用して MC の PGE_1 受容体の分離を試み、細胞の Triton-X-100 処理により分子量約 14 万の蛋白質と、その SDS 処理により分子量約 3 万のペプチドとを得てその性状の一端を明かにした。

以上の成果はがん化肥満細胞の PG による cAMP を介しての増殖と機能分化との相互調節機構ならびに肥満細胞よりのヒスタミン遊離における PG、cAMP 系による自家調節機構の一端を解明したものである。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認定する。